

PRODUCTION OF SUSTAINED RELEASE PREPARATION**BEST AVAILABLE COPY****Publication number:** JP10231252**Publication date:** 1998-09-02**Inventor:** YAMAGATA YUTAKA; OMAE MASAFUMI; IWASA
SUSUMU**Applicant:** TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD**Classification:****- international:** **A61K9/52; A61K38/27; A61K47/34; A61K9/52;
A61K38/27; A61K47/34; (IPC1-7): A61K38/27;
A61K9/52; A61K47/34****- european:****Application number:** JP19970349888 19971219**Priority number(s):** JP19970349888 19971219; JP19960342046 19961220

Report a data error here

Abstract of JP10231252

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for producing a sustained release preparation, capable of increasing uptake ratio of physiologically active polypeptide and exhibiting high blood concentration over a long period by dispersing a physiologically active polypeptide into an organic solvent solution of an in vivo degradable polymer and zinc oxide and removing an organic solvent.

SOLUTION: A physiologically active polypeptide, preferably having about 1,000-50,000 molecular weight (e.g. growth hormone or insulin) is dispersed, preferably in a ratio of about 1-50% into an organic solvent (e.g. dichloromethane) solution containing in vivo degradable polymer (e.g. lactic acid-glycolic acid copolymer) and about 0.001-2wt.% zinc oxide, and then, an organic solvent is removed by a method such as underwater drying method, a phase separation method, spray-drying method to provide the objective sustained release preparation. The daily dose of the sustained release preparation can properly be selected from a range of about 0.0001-10mg/kg weight adult as an active ingredient in the case of one week-type preparation.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-231252

(43)公開日 平成10年(1998)9月2日

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

F I

A 6 1 K 38/27

A 6 1 K 37/36

9/52

9/52

H

47/34

47/34

C

審査請求 未請求 請求項の数15 O L (全 12 頁)

(21)出願番号 特願平9-349888

(71)出願人 000002934

(22)出願日 平成9年(1997)12月19日

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(31)優先権主張番号 特願平8-342046

(72)発明者 山縣 豊

兵庫県神戸市須磨区道正台1丁目1番8-

(32)優先日 平8(1996)12月20日

207号

(33)優先権主張国 日本 (J P)

(72)発明者 御前 雅文

兵庫県宝塚市山本丸橋3丁目2番7-413号

(72)発明者 岩佐 進

京都府京田辺市大住ヶ丘1丁目21番地の2

(74)代理人 弁理士 朝日奈 忠夫 (外2名)

(54)【発明の名称】 徐放性製剤の製造法

(57)【要約】

【課題】生理活性ポリペプチドの取り込み率を高め、しかも長期に亘り高値かつ、一定した血中濃度を示す徐放性製剤の製造法を提供する。

【解決手段】生体内分解性ポリマーと酸化亜鉛との有機溶媒溶液に生理活性ポリペプチドを分散させた後、有機溶媒を除去することを特徴とする徐放性製剤の製造法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】生体内分解性ポリマーと酸化亜鉛とを含有する有機溶媒溶液に生理活性ポリペプチドを分散させた後、有機溶媒を除去することを特徴とする徐放性製剤の製造法。

【請求項2】生理活性ポリペプチドが成長ホルモンである請求項1記載の製造法。

【請求項3】生体内分解性ポリマーが乳酸-グリコール酸共重合体である請求項1記載の製造法。

【請求項4】乳酸-グリコール酸共重合体の乳酸/グリコール酸組成比(モル%)が、約85/15~約50/50である請求項3記載の製造法。

【請求項5】乳酸-グリコール酸共重合体の重量平均分子量が、約8,000~約20,000である請求項3記載の製造法。

【請求項6】有機溶媒溶液中の生体内分解性ポリマーに対する亜鉛の含有量が約0.001~約2%(W/W)である請求項1記載の製造法。

【請求項7】徐放性製剤の平均粒子径が約0.1~約300 μ mである請求項1記載の製造法。

【請求項8】徐放性製剤が注射用である請求項1記載の製造法。

【請求項9】乳酸-グリコール酸共重合体と酸化亜鉛とを含有する有機溶媒溶液に成長ホルモンを分散させた分散液を油相とするo/w型乳化物を、水中乾燥することを特徴とする請求項1記載の製造法。

【請求項10】徐放性製剤が徐放性マイクロカプセルである請求項1記載の製造法。

【請求項11】乳酸-グリコール酸共重合体と酸化亜鉛とを含有する有機溶媒溶液。

【請求項12】乳酸-グリコール酸共重合体と酸化亜鉛とを有機溶媒中に共存させることにより得られる有機溶媒溶解性の乳酸-グリコール酸共重合体・酸化亜鉛体。

【請求項13】乳酸-グリコール酸共重合体と酸化亜鉛とを含有する有機溶媒溶液に生理活性ポリペプチドを分散させた分散液。

【請求項14】生理活性ポリペプチドが成長ホルモンである請求項13記載の分散液。

【請求項15】請求項1記載の製造法で製造される徐放性製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、生理活性ポリペプチドを含有する徐放性製剤の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】生理活性ポリペプチドまたはその誘導体は、生体において種々の薬理作用を示すことが知られており、このうちいくつかについては遺伝子工学、細胞工学の手法の発達により大腸菌、酵母、動物細胞あるいはヤギ、ハムスターなどの生体を用いて大量に生産され、

医薬品としての応用が図られている。しかしながら、これらの生理活性ポリペプチドは一般的に生体内での半減期が短いために、頻回投与が必要であり、注射に伴う患者の肉体的負担は無視できないものがある。例えば、成長ホルモン(以下、GHと略記することがある)は、元来下垂体前葉で産生・分泌される代表的なホルモんで、身体の成長促進に働くほか、糖・脂質代謝、蛋白同化、細胞増殖や分化に関与するなど、幅広く多彩な生理作用を有する生理活性ポリペプチドであるが、現在では遺伝子組換え技術を用いて大腸菌により大量生産され、医薬品として全世界で広く臨床応用されている。しかしながら、GHは生体内半減期が短く、有効血中濃度を維持するためには頻回投与が必要であり、特に下垂体性小人症の場合には、乳幼児あるいは若年患者に対して数カ月から10年以上の長期に亘る連日皮下投与がなされているのが実情である。この問題を解決するため生理活性ポリペプチドを含有する徐放性製剤を開発する種々の試みがなされている。

【0003】特開平8-3055(EP-A 633020)には、水溶性ポリペプチドを生体内分解性ポリマーと脂肪酸金属塩とからなる生体内分解性マトリックスに水中で浸透させる徐放性製剤の製造法および該製造法で調製された徐放性マイクロカプセル(以下、MCと略記することがある)が開示されている。特開平8-217691(WO 96/07399)には、水溶性ペプチド性生理活性物質を塩化亜鉛水溶液等を用い水不溶性ないし水難溶性多価金属塩とし、これと生体内分解性ポリマーとを含有してなる徐放性製剤の製造法が開示されている。WO94/12158には、ヒトGHと生体内分解性ポリマーとの徐放性製剤の製造法として、ポリマーに対して、0.1-30%(w/w)水酸化亜鉛などのポリマー分解促進剤をポリマー溶液に加えることができるとの記載がある。また、ヒトGHとポリマーを含有する有機溶媒溶液を液体窒素中に噴霧し多孔性粒子として生物活性を保持した形でMCを調製する方法が開示されている。またWO 92/17200およびネイチャー・メディスン(Nature Medicine)、第2巻、795頁(1996)には、ヒトGHの亜鉛塩を用いる徐放性製剤の製造法が開示されている。WO 95/29664には、炭酸亜鉛などの金属塩を固体状態でポリマー溶液に分散させた後、生理活性物質(ホルモンなど)を添加し、生理活性物質と金属カチオンとを別々に生体分解性ポリマーに分散させてなるMCを製造する方法が開示されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】前記のように生理活性ポリペプチドの生理活性を保持しながら徐放性製剤を製造する試みが種々成されているものの、生理活性ポリペプチドによっては、製剤内への生理活性ポリペプチドの取り込み率が低い、投与初期の過剰放出がある、長期に

わたる安定した放出性が達成されない、十分な血中濃度が長期にわたって保持できないなどの点で、未だ臨床上満足すべき製剤は得られていない。また製造方法においても大量生産を前提とする工業化に合致しない方法が多いのが現状である。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記の問題点を解決するため鋭意研究を進め、MC基剤として用いる乳酸-グリコール酸共重合体（以下、PLGAと略記することがある）と酸化亜鉛とを有機溶媒中で共存させると、意外にもそれ自体では有機溶媒に不溶の酸化亜鉛が有機溶媒に溶解し、効率良く含量の高いPLGA・酸化亜鉛体が得られ、該PLGA・酸化亜鉛体の有機溶媒溶液に直接生理活性ポリペプチドを粉末として分散させ成型すると、生理活性ポリペプチドの取り込み率が向上し、投与後の初期放出が抑制され、さらには持続性に優れた徐放性製剤が得られることを見いだした。また、該製造法は工程数が少なく、きわめて工業化に適した方法であることを見だし、さらに検討を重ね、本発明を完成した。すなわち、本発明は、（1）生体内分解性ポリマーと酸化亜鉛とを含有する有機溶媒溶液に生理活性ポリペプチドを分散させた後、有機溶媒を除去することを特徴とする徐放性製剤の製造法、（2）生理活性ポリペプチドが成長ホルモンである前記（1）記載の製造法、（3）生体内分解性ポリマーが乳酸-グリコール酸共重合体である前記（1）記載の製造法、（4）乳酸-グリコール酸共重合体の乳酸/グリコール酸組成比（モル%）が、約85/15～約50/50である前記

（3）記載の製造法、

【0006】（5）乳酸-グリコール酸共重合体の重量平均分子量が、約8,000～約20,000である前記（3）記載の製造法、（6）有機溶媒溶液中の生体内分解性ポリマーに対する亜鉛の含有量が約0.001～約2%（W/W）である前記（1）記載の製造法、（7）徐放性製剤の平均粒子径が約0.1～約300 μ mである前記（1）記載の製造法、（8）徐放性製剤が注射用である前記（1）記載の製造法、（9）乳酸-グリコール酸共重合体と酸化亜鉛とを含有する有機溶媒溶液に成長ホルモンを分散させた分散液を油相とするo/w型乳化物を、水中乾燥することを中心とする前記（1）記載の製造法、（10）徐放性製剤が徐放性マイクロカプセルである前記（1）記載の製造法、（11）乳酸-グリコール酸共重合体と酸化亜鉛とを含有する有機溶媒溶液、（12）乳酸-グリコール酸共重合体と酸化亜鉛とを有機溶媒に共存させることにより得られる有機溶媒溶解性の乳酸-グリコール酸共重合体・酸化亜鉛体、（13）乳酸-グリコール酸共重合体と酸化亜鉛とを含有する有機溶媒溶液に生理活性ポリペプチドを分散させた分散液、（14）生理活性ポリペプチドが成長ホルモンである前記（13）記載の分散液、および（15）前記

（1）記載の製造法で製造される徐放性製剤に関する。

【0007】本発明に用いられる好ましい生体内分解性ポリマーの具体例としては、例えば α -ヒドロキシカルボン酸類（例、グリコール酸、乳酸等）、ヒドロキシジカルボン酸類（例、リンゴ酸等）、ヒドロキシトリカルボン酸（例、クエン酸等）等の1種以上から無触媒脱水重縮合で合成され、遊離のカルボキシル基を有する重合体あるいはこれらの混合物、ポリ- α -シアノアクリル酸エステル、ポリアミノ酸（例、ポリ- γ -ベンジル-L-グルタミン酸等）、無水マレイン酸系重合体（例、スチレン-マレイン酸重合体等）等が挙げられる。重合の形式は、ランダム、ブロック、グラフトのいずれでもよい。また、上記 α -ヒドロキシカルボン酸類、ヒドロキシジカルボン酸類、ヒドロキシトリカルボン酸類が分子内に光学活性中心を有する場合、D-、L-、DL-体のいずれも用いることができる。これらの中で、末端に遊離のカルボキシル基を有する生体内分解性ポリマー、例えば α -ヒドロキシカルボン酸類（例、グリコール酸、乳酸等）から合成された重合体（例、乳酸-グリコール酸共重合体等）、ポリ- α -シアノアクリル酸エステル等が好ましい。生体内分解性ポリマーは、さらに好ましくは α -ヒドロキシカルボン酸類から合成された重合体、特に好ましくは乳酸-グリコール酸共重合体である。

【0008】生体内分解性ポリマーとして乳酸-グリコール酸共重合体又は単重合体を用いる場合、その組成比（モル%）は約100/0ないし約40/60が好ましく、約85/15ないし約50/50が更に好ましい。本明細書においては、ポリ乳酸、ポリグリコール酸など単重合体のみならず乳酸-グリコール酸共重合体も含めて、単に乳酸-グリコール酸重合体と称することがある。前記乳酸-グリコール酸重合体の重量平均分子量は、約3,000ないし約25,000が好ましく、さらに約5,000から約20,000が特に好ましい。また、乳酸-グリコール酸重合体の分散度（重量平均分子量/数平均分子量）は約1.2ないし約4.0が好ましく、約1.5ないし約3.5が更に好ましい。

【0009】なお、本明細書での重量平均分子量および分散度に関し、前者は重量平均分子量が120,000、52,000、22,000、9,200、5,050、2,950、1,050、580、162の9種類のポリスチレンを基準物質としてゲルパーミエーションクロマトグラフィー（GPC）で測定したポリスチレン換算の値、後者はこの値から算出した値である。測定は、GPCカラムKF804L x 2（昭和電工製）、RIモニター L-3300（日立製作所製）を使用し、移動相としてクロロホルムを用いて行った。また、末端に遊離のカルボキシル基を有する生体内分解性ポリマーとは、末端基定量による数平均分子量と上記のGPC測定による数平均分子量がほぼ一致するポリマーであり、末端基定量による数平均分子量は以下のようにして算出

される。

【0010】約1gないし約3gの生体内分解性ポリマーをアセトン(25ml)とメタノール(5ml)との混合溶媒に溶解し、フェノールフタレインを指示薬としてこの溶液中のカルボキシル基を0.05Nアルコール性水酸化カリウム溶液で、室温(20℃)で攪拌下、速やかに滴定して末端基定量による数平均分子量を次式で算出した。

末端基定量による数平均分子量 = $20000A/B$

A: 生体内分解性ポリマーの質量 (g)

B: 滴定終点までに添加した0.05Nアルコール性水酸化カリウム溶液 (ml)

末端基定量による数平均分子量が絶対値であるのに対して、GPC測定による数平均分子量は、各種分析・解析条件(例えば、移動相の種類、カラムの種類、基準物質、スライス幅の選択、ベースラインの選択等)によって変動する相対値であるため、一義的な数値化は困難であるが、両測定による数平均分子量がほぼ一致するとは、例えば、 α -ヒドロキシカルボン酸類から合成された重合体において、末端基定量による数平均分子量がGPC測定による数平均分子量の約0.5倍から約2倍の範囲内であることをいう。好ましくは、約0.7倍から約1.5倍の範囲内であることをいう。例えば、1種類以上の α -ヒドロキシカルボン酸類から無触媒脱水重縮合法で合成され、末端に遊離のカルボキシル基を有する重合体では、GPC測定による数平均分子量と末端基定量による数平均分子量とがほぼ一致する。これに対し、環状二量体から触媒を用いて開環重縮合法で合成され、末端に遊離のカルボキシル基を本質的には有しない重合体では、末端基定量による数平均分子量がGPC測定による数平均分子量の約2倍以上に大きく上回る。この相違によって末端に遊離のカルボキシル基を有する重合体は、末端に遊離のカルボキシル基を有しない重合体と明確に区別することができる。

【0011】末端に遊離のカルボキシル基を有する乳酸-グリコール酸重合体は、自体公知の製造法、例えば特開昭61-28521号公報に記載の方法(例えば無触媒下の脱水重縮合反応や無機固体酸触媒下での脱水重縮合反応による製造方法)に従って製造できる。乳酸-グリコール酸重合体の分解・消失速度は、組成比あるいは重量平均分子量によって大きく変化するが、一般的にはグリコール酸分率が低いほど分解・消失が遅いため、グリコール酸分率を低くするかあるいは分子量を大きくすることによって放出期間を長くすることができる。逆に、グリコール酸分率を高くするかあるいは分子量を小さくすることによって放出期間を短くすることもできる。長期間(例えば、1ないし4カ月)型徐放性製剤とするには、前記組成比および重量平均分子量の範囲の乳酸-グリコール酸重合体が好ましい。

【0012】従って、本発明において、用いる生体内分

解性ポリマーの組成は、目的とする生理活性ポリペプチドの種類、所望の徐放期間などに応じて、選択されることが好ましい。その具体的な1例として、例えば、生理活性ポリペプチドとしてGHを用いる場合、乳酸-グリコール酸共重合体を用いることが好ましく、該乳酸-グリコール酸共重合体としては、その乳酸/グリコール酸組成比(モル%)が約85/15~約50/50が好ましく、さらに好ましくは約75/25~約50/50である。またその重量平均分子量は約8,000~約20,000が好ましく、さらに好ましくは約10,000~約20,000である。また、乳酸-グリコール酸共重合体の分散度(重量平均分子量/数平均分子量)は約1.2~約4.0が好ましく、さらに好ましくは約1.5~約3.5である。用いる乳酸-グリコール酸共重合体は、前記公報記載の方法等、公知の方法に従い製造できる。該共重合体は無触媒脱水重縮合で製造されたものが好ましい。前記GPC測定法による数平均分子量と末端基定量法による数平均分子量とが、ほぼ一致する乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)を用いることが好ましい。また、該共重合体は組成比および重量平均分子量の異なる2種の乳酸-グリコール酸共重合体を任意の割合で混合して用いてもよい。このような例としては、例えば組成比(乳酸/グリコール酸)(モル%)が約75/25で重量平均分子量が約10,000の乳酸-グリコール酸共重合体と、組成比(乳酸/グリコール酸)(モル%)が約50/50で重量平均分子量が約12,000の乳酸-グリコール酸共重合体との混合物などが用いられる。混合する際の重量比は、好ましくは約25/75~約75/25である。

【0013】本発明において、PLGA・酸化亜鉛体を作製するために用いられる酸化亜鉛は水難溶性亜鉛化合物であり、それ自体ではジクロロメタンなどの有機溶媒にも不溶ないし難溶性である。酸化亜鉛はPLGAと共にジクロロメタンなどの有機溶媒中に共存させると、全く予想外に効率良くPLGA・酸化亜鉛体を形成して有機溶媒に溶解する。これらの操作は単にPLGAと酸化亜鉛とを有機溶媒に添加するだけで達成され、従ってPLGA・酸化亜鉛体の分離操作が不要である。こうして得られたPLGA・酸化亜鉛体の有機溶媒溶液に直接生理活性ポリペプチドを添加して、簡便に生理活性ポリペプチド含有MCを調製できる。また得られたMCは生理活性ポリペプチドを生物学的に安定に保ち、初期放出の小さい持続性に優れた徐放性製剤を提供する。

【0014】本発明において用いられる生理活性ポリペプチドとしては、好ましくは分子量約1,000~約50,000、さらに好ましくは分子量約5,000~約40,000の生理活性ポリペプチドが用いられる。生理活性ポリペプチドの活性として代表的なものとしては、ホルモン作用が挙げられる。また該生理活性ポリペプチドは天然物、合成物、半合成物のいずれでもよく、さら

にそれらの誘導体ないし類縁体でもよい。該生理活性ポリペプチドの作用機作は、作動性あるいは拮抗性のいずれでもよい。本発明の生理活性ポリペプチドとしては、例えばペプチドホルモン、サイトカイン、ペプチド性神経伝達物質、造血因子、各種増殖因子、酵素、ポリペプチド系抗生物質、鎮痛性ペプチドなどが用いられる。

【0015】ペプチドホルモンとしては、例えばインスリン、ソマトスタチン、ソマトスタチン誘導体（サンドスタチン、米国特許第4,087,390号、同第4,093,574号、同第4,100,117号、同第4,253,998号参照）、成長ホルモン（GH）、ナトリウム利尿ペプチド、ガストリン、プロラクチン、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、ACTH誘導体（エビラタイドなど）、メラノサイト刺激ホルモン（MSH）、甲状腺ホルモン放出ホルモン（TRH）その塩およびその誘導体（特開昭50-121273号、特開昭52-116465号公報参照）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、黄体形成ホルモン（LH）、卵胞刺激ホルモン（FSH）、ヒト絨毛ゴナドトロピン（HCG）、サイモシン（チモシン）、モチリン、バソプレシン、バソプレシン誘導体（デスモプレシン〔日本内分泌学会雑誌、第54巻 第5号 第676～691頁（1978）〕参照）、オキシトシン、カルシトニン、副甲状腺ホルモン（PTH）、グルカゴン、セクレチン、パングレオザイミン、コレシストキニン、アンジオテンシン、ヒト胎盤ラクトゲンなどが用いられる。ペプチドホルモンは、好ましくはインスリン及び成長ホルモンなどである。サイトカインとしては、例えばリンホカイン、モノカインなどが用いられる。リンホカインとしては、例えばインターフェロン類（アルファ型、ベータ型、ガンマ型等）、インターロイキン類（例えば、IL-2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12等）などが用いられる。モノカインとしては、例えばインターロイキン-1（IL-1）、腫瘍壊死因子（TNF）などが用いられる。サイトカインは、好ましくはリンホカインなどであり、更に好ましくはインターフェロンなどである。サイトカインは、特に好ましくはインターフェロンアルファなどである。ペプチド性神経伝達物質としては、例えばサブスタンスP、セロトニン、GABAなどが用いられる。

【0016】造血因子としては、例えばエリスロポエチン（EPO）、コロニー刺激因子（G-CSF, GM-CSF, M-CSF等）、トロンプオエチン（TPO）、血小板増殖刺激因子、メガカリオサイトポテンシエーターなどが用いられる。各種増殖因子としては、例えば塩基性あるいは酸性の繊維芽細胞増殖因子（FGF）あるいはこれらのファミリー（例、EGF、TGF- α 、TGF- β 、PDGF、酸性FGF、塩基性FGF、FGF-9など）、神経細胞増殖因子（NGF）あるいはこれらのファミリー（例えば、BDNF、NT-

3、NT-4、CNTF、GDNF等）、インスリン様成長因子（例、IGF-1、IGF-2など）、骨増殖に関与する因子（BMP）あるいはこれらのファミリーなどが用いられる。酵素としては、例えばスーパーオキシドディスムターゼ（SOD）、ウロキナーゼ、ティシュープラスミノゲンアクティベーター（TPA）、アスパラギナーゼ、カリクレインなどが用いられる。ポリペプチド系抗生物質としては、例えばポリミキシンB、コリスチン、グラミシジン、バシトラシンなどが用いられる。鎮痛性ペプチドとしては、例えばエンケファリン、エンケファリン誘導体〔米国特許第4,277,394号、ヨーロッパ特許出願公開第31567号公報参照〕、エンドルフィン、キョウトルフィンなどが用いられる。その他、生理活性ポリペプチドとしては、サイモポエチン、ダイノルフィン、ボムベシン、セルレイン、サイモスチムリン、胸腺液性因子（THF）、血中胸腺因子（FTS）およびその誘導体（米国特許第4,229,438号参照）、およびその他の胸腺因子〔医学のあゆみ、第125巻、第10号、835-843頁（1983年）〕、ニューロテンシン、ブラジキニンおよびエンドセリン拮抗作用を有するペプチド類（ヨーロッパ特許公開第436189号、同第457195号、同第496452号、特開平3-94692号、同3-130299号公報参照）などが挙げられる。本発明に特に好ましく適用される生理活性ポリペプチドとしては、成長ホルモン、インスリンなどが挙げられる。

【0017】本発明において、生理活性ポリペプチドが金属を含有する場合、その金属含有量は0.1%以下が好ましく、さらに好ましくは0.01%以下、特に好ましくは0.001%以下であって実質的に金属を含まない生理活性ポリペプチドが最適である。例えば結晶性インスリンは、通常亜鉛、ニッケル、コバルト、カドミウムなどの少量の重金属を含んでいる。0.4%（w/w）亜鉛を含んでいるインスリンは6量体で存在し、それ自身で安定に存在し、生体内分解性高分子重合物の金属塩との相互作用が弱められると考えられる。必要な場合には、生理活性ポリペプチドに含有されている金属を前もって除去しておいてもよく、金属を除去する方法としては公知の方法が用いられる。例えばインスリンの塩酸酸性水溶液を、水あるいは酢酸アンモニウム塩溶液に対して透析したのち凍結乾燥することによりアモルファス状態で金属が最小限のインスリンが得られる。成長ホルモンとしては、いずれの種由来のものでも良いが、好ましくはヒト由来である。また下垂体などから抽出される天然由来も本発明に用いられるが、好ましくは遺伝子組換え型GH（特公平6-12996号公報、特公平6-48987号公報）である。さらに好ましくはN末端にメチオニンを有さない天然型と同じ構造を有する組換え型ヒトGHである。かかるGHとしては金属塩であってもよいが、また実質的に金属を含有しないものも用い

られる。

【0018】本発明に用いる有機溶媒は、沸点120℃以下であることが好ましい。該有機溶媒としては、例えばハロゲン化炭化水素（例、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素など）、アルコール類（例、エタノール、メタノール、1,4-ブタンジオール、1,5-ペンタンジオールなど）、酢酸エチル、アセトニトリルなどが挙げられる。これらは適宜の割合で混合して用いてもよい。有機溶媒を単独で用いる場合、例えばジクロロメタン、アセトニトリルなどが好ましい。有機溶媒を混合溶媒として用いる場合、例えばハロゲン化炭化水素（例、ジクロロメタン、クロロホルムなど）と、アルコール類（例、エタノール、メタノール、1,4-ブタンジオール、1,5-ペンタンジオールなど）あるいはアセトニトリルとの組み合わせが好ましい。特に、ジクロロメタンとアセトニトリルとの組み合わせが汎用される。ハロゲン化炭化水素と、アルコール類あるいはアセトニトリルとの混合比（体積比）は約40:1～約1:1であり、好ましくは約20:1～約1:1である。特に、ハロゲン化炭化水素（ジクロロメタンなど）を単独で用いることが望ましい。

【0019】本発明において、徐放性製剤の製造に用いる酸化亜鉛は、微粉状であることが好ましく、粒子径が小さい程、反応時間の短縮が期待できるが、同時に飛散性が上昇するため取り扱い上の問題が生じる。酸化亜鉛の粒子径は、通常、約0.001 μm ～約10 μm 、好ましくは約0.005 μm ～約1 μm 、さらに好ましくは約0.01 μm ～約0.1 μm である。生体内分解性ポリマーと酸化亜鉛との有機溶媒溶液において、生体内分解性ポリマーに対する亜鉛（Zn）の含量は、重量比で好ましくは約0.001～約2%（W/W）、さらに好ましくは約0.01～約2%（W/W）、特に好ましくは約0.1～約2%（W/W）である。なお生体内分解性ポリマーと酸化亜鉛との有機溶媒溶液中の亜鉛含量は、例えば原子吸光法などの分析学上の一般公知方法により定量される。本明細書において、徐放性製剤とは、生理活性ポリペプチドとマイクロカプセル基剤（生体内分解性ポリマー・酸化亜鉛体）とを含有する微粒子であればよく、その具体例としては、例えば1個の粒子中に1個の薬物コアを含有するマイクロカプセル、1個の粒子中に多数の薬物コアを含有する多核マイクロカプセル、または分子状で薬物がマイクロカプセル基剤に溶解あるいは分散しているようなマイクロスフェア等が挙げられる。

【0020】本発明の徐放性製剤は、生体内分解性ポリマーと酸化亜鉛との有機溶媒溶液に生理活性ポリペプチドを分散させ、有機溶媒を除去することにより製造される。本明細書においては、生体内分解性ポリマーと酸化亜鉛とが有機溶媒に溶解した澄明な溶液中において形成されている生体内分解性ポリマーと酸化亜鉛とから生成

される生成物を「生体内分解性ポリマー・酸化亜鉛体」と称する。該生体内分解性ポリマー・酸化亜鉛体は、通常の塩、錯塩、複塩、有機金属化合物など、分子間の結合によって生じた化合物ないし組成物であってもよい。該生体内分解性ポリマー・酸化亜鉛体は、有機溶媒に溶解するとともに、最終目的物である徐放性製剤に優れた徐放性を付与するという特性を有する。また、生体内分解性ポリマーがPLGAであるものを「PLGA・酸化亜鉛体」と称する。本明細書においては「分散」とは生理活性ポリペプチドが有機溶媒中に均質に分散していることを示しており、生理活性ポリペプチドの有機溶媒溶液および懸濁液のいずれも本発明の分散液に含まれる。本発明の製造法において、有機溶媒の除去方法としては、例えば（a）水中乾燥法（O/W法）、（b）相分離法（コアセルベーション法）、（c）噴霧乾燥法およびこれらに準じた方法などが用いられる。以下に徐放性製剤として、例えばマイクロカプセルを製造する場合の製造方法について記述する。本発明製造法においては、まず生体内分解性ポリマーと酸化亜鉛とを有機溶媒中に共存させて、生体内分解性ポリマー・酸化亜鉛体の有機溶媒溶液を製造する。この際、生体内分解性ポリマーの溶液中濃度は、分子量、有機溶媒などの種類によって異なるが、例えば約0.1～約80%（W/W）、好ましくは約1～約70%（W/W）、さらに好ましくは約2～約60%（W/W）である。また添加する酸化亜鉛量は、有機溶媒の種類によって異なるが、例えば生体内分解性ポリマー量の約0.001～約5%（W/W）、好ましくは約0.01～約2.5%（W/W）、さらに好ましくは約0.1～約2.5%（W/W）である。有機溶媒への生体内分解性ポリマー及び酸化亜鉛の添加順序は、生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液に酸化亜鉛を粉末状であるいは該有機溶媒に懸濁した状態で添加してもよく、逆に酸化亜鉛の有機溶媒懸濁液中に生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液を添加してもよい。また、両者を粉末状で混和後、有機溶媒を添加してもよい。

【0021】PLGA・酸化亜鉛体などの生体内分解性ポリマー・酸化亜鉛体の溶液を、生体内分解性ポリマーと酸化亜鉛とから生成させる条件は、用いる生体内分解性ポリマーの種類、酸化亜鉛の粒子径、有機溶媒の種類、これらの組成等により適宜変更されるが、例えばポリマーとしてPLGAを用いる場合、通常、約0～約30℃好ましくは約2～約25℃で、約1時間～約168時間、好ましくは約12時間～約96時間、さらに好ましくは約24時間～約72時間反応させることにより、PLGA・酸化亜鉛体を得ることができる。しかしながら、本発明のPLGA・酸化亜鉛体の生成は、添加時には懸濁状態である酸化亜鉛が有機溶媒に溶解し、澄明な溶液状態となることにより肉眼的に確認することが可能であり、前記範囲に限定される事なく、目視による液状の観察を指標として、反応時間を決定してもよい。同反

応は、PLGAと酸化亜鉛とを単に有機溶媒中に共存させることによっても進行するが、適当な攪拌・振とう手段により、攪拌、振とう下で反応させることは、反応時間短縮において有利である。また、同様に超音波照射下で反応させることも好ましい。ここで、反応温度は高いほど反応時間が短縮されるが、同時にPLGAの分解速度も促進される弊害がある。得られた生体内分解性ポリマー・酸化亜鉛体は、本発明において好ましくは有機溶媒溶液の状態次工程に用いられるが、所望によっては有機溶媒を除去し、一旦固体状としてもよい。

【0022】次いで、前記のようにして得られた生体内分解性ポリマーと酸化亜鉛体との有機溶媒溶液に、生理活性ポリペプチドを好ましくは粉末状で、例えば生体内分解性ポリマー量の約0.1～約50% (W/W)、好ましくは約1～約20% (W/W)、さらに好ましくは約3～約15% (W/W) 添加し、溶解または分散させ、生体内分解性ポリマー、酸化亜鉛および生理活性ポリペプチドとを含有する有機溶媒分散液（以下、単に生理活性ポリペプチド分散液と称することがある）を製造する。生理活性ポリペプチドが、生体内分解性ポリマーと酸化亜鉛との有機溶媒溶液に溶解せず、粉末で添加すると混濁し、分散させにくい性質を有するような場合、生理活性ポリペプチドはあらかじめ有機溶媒中に分散させておくのが好ましい。該有機溶媒中には、例えば生理活性ポリペプチド安定化剤（例えば、血清アルブミン、ゼラチン、硫酸プロタミンなど）を添加してもよい。生理活性ポリペプチドを有機溶媒中に均一に分散させるには、外部物理的エネルギーを加えることが好ましい。その方法として例えば、超音波照射、タービン型攪拌器、ホモジナイザーなどが挙げられる。この時の有機溶媒中での生理活性ポリペプチド粒子サイズとしては、約0.01～約200 μ m、好ましくは約0.05～約100 μ m、さらに好ましくは約0.1～約50 μ mであることが望まれる。また、この時の有機溶媒中での生理活性ポリペプチド濃度は、約1～約50%、好ましくは約2～約20%である。このような処理により有機溶媒中における生理活性ポリペプチドの粒子サイズを一定にして、生体内分解性ポリマーと酸化亜鉛との有機溶媒溶液中に均一に分散させることが可能となる。また、生理活性ポリペプチドは、予め生体内分解性ポリマー・酸化亜鉛体とは独立して有機溶媒に分散させてもよい。この場合、用いる有機溶媒は、生体内分解性ポリマーと酸化亜鉛体とを溶解した有機溶媒と同一の組成でも、また異なってもよい。例えば、生体内分解性ポリマー・酸化亜鉛体をジクロロメタンに溶解し、生理活性ポリペプチドをアセトニトリルに分散させ、両者を混合してもよい。この際、生理活性ポリペプチドと生体内分解性ポリマー・酸化亜鉛体との比率（容量比）は、例えば約1:1000～約1:1、好ましくは約1:200～約1:5、特に好ましくは約1:100～約1:5である。

【0023】(a) 水中乾燥法 (o/w法)

前記のようにして調製された生理活性ポリペプチド分散液をさらに水相中に加えて、o/w型エマルションを形成させた後、油相中の溶媒を揮散させ、マイクロカプセルを製造する。この際、該外水相中に乳化剤を加えてもよい。該乳化剤は、一般的に安定なo/w型エマルションを形成できるものであれば何れでもよい。具体的には、例えばアニオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、カルボキシメチルセルロース、レシチン、ゼラチン、ヒアルロン酸などが用いられる。該乳化剤は、好ましくはポリビニルアルコールである。該乳化剤は、1種類または2種以上を組み合わせ使用してもよい。外水相中の乳化剤の濃度は、約0.001～約20% (w/w)、好ましくは約0.01～約10% (w/w)、さらに好ましくは約0.05%～約5% (w/w) である。

【0024】このようにして得られたマイクロカプセルは、遠心分離あるいは濾過操作により分取した後、マイクロカプセルの表面に付着している乳化剤などを蒸留水による洗浄で除去し、再び蒸留水などに分散して凍結乾燥する。その後必要であれば、加温してマイクロカプセル中の水分および有機溶媒をさらに除去する。減圧下に加温してもよい。加温条件としては、用いた生体内分解性ポリマーのガラス転移温度以上で、マイクロカプセルの各粒子が互いに付着しない程度の温度で加熱乾燥する。好ましくは、生体内分解性ポリマーのガラス転移温度からガラス転移温度より約30℃高い温度の範囲で加熱乾燥する。ここにおいて、ガラス転移温度とは、示差走査熱量計を用い、加温速度毎分10ないし20℃で昇温した際に得られる中間点をいう。

【0025】(b) 相分離法 (コアセルベーション法)

本法によりMCを製造する場合には、前記の生理活性ポリペプチド分散液にコアセルベーション剤を攪拌下徐々に加え、MCを析出、固化させる。該コアセルベーション剤の添加量は、上記分散液の約0.01倍～約1,000倍の体積量、好ましくは約0.05倍～約500倍の体積量、さらに好ましくは約0.1倍～約200倍の体積量である。コアセルベーション剤としては、生体内分解性ポリマーを溶解する有機溶媒と混和する高分子系、鉱物油系または植物油系の化合物で使した生体内分解性ポリマーを溶解しないものであればよい。具体的には、例えばシリコン油、ゴマ油、大豆油、コーン油、綿実油、ココナッツ油、アマニ油、鉱物油、n-ヘキサン、n-ヘプタンなどが用いられる。これらは2種以上混合して用いてもよい。このようにして得られたMCを濾過分取した後、ヘプタン等により繰り返し洗浄してコアセルベーション剤を除去する。さらに、前記(a)と同様に洗浄し、次いで凍結乾燥する。水中乾燥法およびコアセルベーション法でのMCの製造では、MCの洗浄

の際に、粒子同士の凝集を防ぐために凝集防止剤を加えてもよい。該凝集防止剤としては、例えばマンニトール、ラクトース、ブドウ糖、デンプン類（例、コーンスターチ等）、ヒアルロン酸あるいはこのアルカリ金属塩などの水溶性多糖類；グリシン、アラニンなどのアミノ酸類；フィブリン、コラーゲン等の蛋白質；塩化ナトリウム、リン酸水素ナトリウム等の無機塩類などが適宜用いられる。

【0026】(c) 噴霧乾燥法

本法によってMCを製造する場合には、生理活性ポリペプチド分散液を、ノズルを用いてスプレードライヤー（噴霧乾燥器）の乾燥室内へ噴霧し、極めて短時間に微粒化液滴内の有機溶媒を揮発させ、MCを製造する。該ノズルとしては、例えば二流体ノズル型、圧力ノズル型、回転ディスク型などがある。この際所望により、上記の分散液と同時に、MC粒子同志の凝集防止を目的として前記凝集防止剤の水溶液を別ノズルより噴霧することも有効である。このようにして得られたMCは、前記(a)と同様にして洗浄し、必要であれば加温（要すれば減圧下）により、水分および有機溶媒をさらに除去する。

【0027】本発明において、PLGA・酸化亜鉛体をマイクロカプセル基剤とする場合、MCへの生理活性ポリペプチド、例えばGHの取り込み率は約50%以上であることが望ましい。本発明の徐放性製剤に含まれる生理活性ポリペプチドの含量は、例えば約0.1～約30% (w/w)、好ましくは、約0.2～約20% (w/w)、さらに好ましくは約0.5～約10% (w/w)である。本発明の徐放性製剤は、例えば前記で得られたマイクロカプセルなどの微粒子をそのまま、あるいはこの微粒子を製剤原料として用いて、種々の剤型、例えば非経口剤（例、筋肉内、皮下、臓器などへの注射剤または埋め込み剤、鼻腔、直腸、子宮などへの経粘膜剤等）、経口剤（例、カプセル剤（例、硬カプセル剤、軟カプセル剤等）、顆粒剤、散剤等の固形製剤、懸濁剤等の液剤等）などとして投与することができる。これらの剤型の製剤は、製剤製造のために一般に用いられる公知の方法により製造される。

【0028】本発明の徐放性製剤は、特に注射剤であることが好ましい。前記方法で得られたマイクロカプセルなどの微粒子を注射剤とするには、該微粒子を分散剤（例、Tween 80、HCO-60等の界面活性剤、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ヒアルロン酸ナトリウム等の多糖類、硫酸プロタミン、ポリエチレングリコール400など）、保存剤（例、メチルパラベン、プロピルパラベンなど）、等張化剤（例、塩化ナトリウム、マンニトール、ソルビトール、ブドウ糖など）、局所麻酔剤（塩酸キシロカイン、クロロブタノールなど）等と共に水性懸濁剤とするか、ゴマ油、コーン油などの植物油あるいはこれにレシチンなどのリン脂

質を混合したもの、あるいは中鎖脂肪酸トリグリセリド（例、ミグリオール812等）と共に懸濁して油性懸濁剤として徐放性注射剤とする。徐放性製剤は、微粒であることが特に好ましい。徐放性製剤の粒子径は、懸濁注射剤として使用する場合にはその分散度、通針性を満足する範囲であればよく、例えば、平均粒子径として約0.1～約300 μm 、好ましくは約1～約150 μm 、さらに好ましくは約2～約100 μm である。前記した微粒子を無菌製剤にするには、製造全工程を無菌にする方法、ガンマ線で滅菌する方法、防腐剤を添加する方法等が挙げられるが、特に限定されない。

【0029】徐放性製剤は、低毒性で哺乳動物（例、ヒト、牛、豚、犬、ネコ、マウス、ラット、ウサギなど）に対して安全に用いられる。徐放性製剤の適応は、使用する生理活性ポリペプチドにより異なる。徐放性製剤は、該生理活性ポリペプチドが、例えばインスリンである場合には、糖尿病など、インターフェロン α である場合には、ウイルス性肝炎（例、C型肝炎、HBe抗原陽性活動性肝炎など）、癌（例、腎癌、多発性骨髄腫など）など、エリスロポエチンの場合には貧血（例、腎透析時貧血など）など、G-CSFの場合には好中球減少症（例、制ガン剤治療時）、感染症など、IL-2の場合には癌（例、血管内皮腫など）など、FGFの場合には骨折、創傷（床ずれなど）、歯周病、消化管潰瘍など、FGF-9の場合には血小板減少症など、NGFの場合には老人性痴呆、神経病（ニューロパシー）など、TPAの場合には血栓症など、腫瘍壊死因子の場合には癌などの治療または予防に有効である。また、GH含有徐放性製剤では、GHの成長ホルモン作用に基づき、下垂体性小人症だけでなく、ターナー症候群、慢性腎疾患、軟骨異栄養症、さらには成人性下垂体不全症に適応できる。また、GHはダウン症候群、シルバー症候群、骨形成不全症、あるいは若年性慢性関節症などの疾患にも適応され、有効な治療効果を得たとの報告もある。

【0030】徐放性製剤の投与量は、生理活性ポリペプチドの種類と含量、放出の持続時間、対象疾病、対象動物などによって種々異なるが、該生理活性ポリペプチドの有効濃度が体内で保持される量であればよい。該生理活性ポリペプチドの投与量としては、例えば徐放性製剤が1週間型製剤である場合、好ましくは、成人1人当たり約0.0001～約10mg/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。さらに好ましくは約0.0005～約1mg/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。投与回数は、1週間に1回、2週間に1回等、該生理活性ポリペプチドの種類と含量、剤型、放出の持続時間、対象疾病、対象動物などによって適宜選ぶことができる。徐放性製剤の有効成分である生理活性ポリペプチドが、例えばインスリンである場合には、糖尿病の成人に対する投与量は、有効成分として通常、約0.001～約1mg/kg体重、好ましくは約0.01～約0.2

mg/kg体重の範囲から適宜選び、1週間に1回投与するのがよい。

【0031】徐放性製剤の有効成分である生理活性ポリペプチドが、GHの場合には、投与量は、GHの種類と含量、放出の持続時間、対象疾病、対象動物などによって種々異なるが、該GHの有効濃度が体内で保持される量であればよい。上記した疾患の治療において、例えば徐放性製剤が2週間型製剤である場合、GHの投与量は有効成分として、好ましくは、小児あるいは成人1人当たり約0.01～約5mg/kg体重の範囲から適宜選択して安全に投与することができる。さらに好ましくは約0.05～約1mg/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。投与回数は、1週間に1回、2週間に1回あるいは1ヶ月に1回等、GH含量、剤型、放出の持続時間、対象疾病、対象動物などによって適宜選ぶことができる。徐放性製剤は、常温あるいは冷所に保存することが好ましい。徐放性製剤は、冷所に保存することがさらに好ましい。ここでいう常温あるいは冷所とは、日本薬局方において定義されるものである。すなわち、常温とは15～25℃を、冷所とは15℃以下を意味する。

【0032】

【発明の実施の形態】以下に実施例および実験例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

【実施例】

実施例1

乳酸-グリコール酸共重合体（乳酸/グリコール酸=50/50（モル%）、重量平均分子量10000）1gと酸化亜鉛6.6mgとをジクロロメタン1.7mlに添加し、25℃で3日間攪拌（60 rpm）し澄明な乳酸-グリコール酸共重合体・酸化亜鉛体の有機溶媒溶液を得た。この溶液にヒト成長ホルモン凍結乾燥粉末53.0mgを添加し、ボルテックスミキサーおよび小型ホモジナイザーで混合し超音波処理して、ヒト成長ホルモンと乳酸-グリコール酸共重合体・酸化亜鉛体とを含む有機溶媒溶液を得た。この有機溶媒溶液を、あらかじめ18℃に調節しておいた0.1%（w/v）ポリビニルアルコール（PVA）水溶液400mlに注入し、タービン型ホモミキサーを使用してo/w型エマルジョンとした。このo/w型エマルジョンを室温で攪拌し、ジクロロメタンを揮散させ、マイクロカプセルを調製した。得られたマイクロカプセルを遠心分離操作（約1500 rpm）により分取した。次いで蒸留水400mlを用いて2回洗浄後、凍結乾燥し粉末状のヒト成長ホルモン含有マイクロカプセル521mgを得た。

【0033】実施例2

乳酸-グリコール酸共重合体（乳酸/グリコール酸=50/50（モル%）、重量平均分子量10000）1gと酸化亜鉛13.1mgとをジクロロメタン2.3mlに溶解し、乳酸-グリコール酸共重合体・酸化亜鉛体の有

機溶媒溶液を得た。この溶液にヒト成長ホルモン凍結乾燥粉末53.3mgを添加し、実施例1と同様に処理して粉末状のヒト成長ホルモン含有マイクロカプセル536mgを得た。

実施例3

乳酸-グリコール酸共重合体（乳酸/グリコール酸=50/50（モル%）、重量平均分子量10000）1gと酸化亜鉛21.9mgとをジクロロメタン2.8mlに溶解し、乳酸-グリコール酸共重合体・酸化亜鉛体の有機溶媒溶液を得た。この溶液にヒト成長ホルモン凍結乾燥粉末53.8mgを添加し、実施例1と同様に処理して粉末状のヒト成長ホルモン含有マイクロカプセル589mgを得た。

【0034】実施例4

乳酸-グリコール酸共重合体（乳酸/グリコール酸=50/50（モル%）、重量平均分子量12000）1gと酸化亜鉛5.1mgとをジクロロメタン1.9mlに溶解し、乳酸-グリコール酸共重合体・酸化亜鉛体の有機溶媒溶液を得た。この溶液にヒト成長ホルモン凍結乾燥粉末52.9mgを添加し、実施例1と同様に処理して粉末状のヒト成長ホルモン含有マイクロカプセル506mgを得た。

実施例5

乳酸-グリコール酸共重合体（乳酸/グリコール酸=50/50（モル%）、重量平均分子量12000）1gと酸化亜鉛10.2mgとをジクロロメタン2.5mlに溶解し、乳酸-グリコール酸共重合体・酸化亜鉛体の有機溶媒溶液を得た。この溶液にヒト成長ホルモン凍結乾燥粉末53.2mgを添加し、実施例1と同様に処理して粉末状のヒト成長ホルモン含有マイクロカプセル568mgを得た。

【0035】実施例6

乳酸-グリコール酸共重合体（乳酸/グリコール酸=65/35（モル%）、重量平均分子量12000）1gと酸化亜鉛17.0mgとをジクロロメタン3.0mlに溶解し、乳酸-グリコール酸共重合体・酸化亜鉛体の有機溶媒溶液を得た。この溶液にヒト成長ホルモン凍結乾燥粉末53.5mgを添加し、実施例1と同様に処理して粉末状のヒト成長ホルモン含有マイクロカプセル561mgを得た。

実施例7

乳酸-グリコール酸共重合体（乳酸/グリコール酸=50/50（モル%）、重量平均分子量15000）1gと酸化亜鉛4.5mgとをジクロロメタン2.0mlに溶解し、乳酸-グリコール酸共重合体・酸化亜鉛体の有機溶媒溶液を得た。この溶液にヒト成長ホルモン凍結乾燥粉末52.9mgを添加し、実施例1と同様に処理して粉末状のヒト成長ホルモン含有マイクロカプセル540mgを得た。

【0036】実施例8

乳酸-グリコール酸共重合体(乳酸/グリコール酸=50/50(モル%)、重量平均分子量15000)1gと酸化亜鉛8.9mgとをジクロロメタン2.6mlに溶解し、乳酸-グリコール酸共重合体・酸化亜鉛体の有機溶媒溶液を得た。この溶液にヒト成長ホルモン凍結乾燥粉末53.1mgを添加し、実施例1と同様に処理して粉末状のヒト成長ホルモン含有マイクロカプセル559mgを得た。

実施例9

乳酸-グリコール酸共重合体(乳酸/グリコール酸=50/50(モル%)、重量平均分子量15000)1gと酸化亜鉛14.9mgとをジクロロメタン3.1mlに溶解し、乳酸-グリコール酸共重合体・酸化亜鉛体の有機溶媒溶液を得た。この溶液にヒト成長ホルモン凍結乾燥粉末53.4mgを添加し、実施例1と同様に処理して粉末状のヒト成長ホルモン含有マイクロカプセル464mgを得た。

【0037】実施例10

乳酸-グリコール酸共重合体(乳酸/グリコール酸=50/50(モル%)、重量平均分子量20000)1gと酸化亜鉛4.0mgとをジクロロメタン2.5mlに溶解し、乳酸-グリコール酸共重合体・酸化亜鉛体の有機溶媒溶液を得た。この溶液にヒト成長ホルモン凍結乾燥粉末52.8mgを添加し、実施例1と同様に処理して粉末状のヒト成長ホルモン含有マイクロカプセル595mgを得た。

実施例11

乳酸-グリコール酸共重合体(乳酸/グリコール酸=50/50(モル%)、重量平均分子量20000)1gと酸化亜鉛7.9mgとをジクロロメタン3.6mlに溶解し、乳酸-グリコール酸共重合体・酸化亜鉛体の有機溶媒溶液を得た。この溶液にヒト成長ホルモン凍結乾燥粉末53.1mgを添加し、実施例1と同様に処理して粉末状のヒト成長ホルモン含有マイクロカプセル478mgを得た。

【0038】実施例12

乳酸-グリコール酸共重合体(乳酸/グリコール酸=50/50(モル%)、重量平均分子量20000)1gと酸化亜鉛13.2mgとをジクロロメタン5.2mlに溶解し、乳酸-グリコール酸共重合体・酸化亜鉛体の有機溶媒溶液を得た。この溶液にヒト成長ホルモン凍結乾燥粉末53.3mgを添加し、実施例1と同様に処理して粉末状のヒト成長ホルモン含有マイクロカプセル534mgを得た。

実施例13

乳酸-グリコール酸共重合体(乳酸/グリコール酸=75/25(モル%)、重量平均分子量10500)1gと酸化亜鉛6.6mgとをジクロロメタン3.0mlに溶解し、乳酸-グリコール酸共重合体・酸化亜鉛体の有機溶媒溶液を得た。この溶液にヒト成長ホルモン凍結乾燥

粉末53.0mgを添加し、実施例1と同様に処理して粉末状のヒト成長ホルモン含有マイクロカプセル521mgを得た。

【0039】実施例14

乳酸-グリコール酸共重合体(乳酸/グリコール酸=85/15(モル%)、重量平均分子量12000)1gと酸化亜鉛5.8mgとをジクロロメタン2.0mlに溶解し、乳酸-グリコール酸共重合体・酸化亜鉛体の有機溶媒溶液を得た。この溶液にヒト成長ホルモン凍結乾燥粉末53.0mgを添加し、実施例1と同様に処理して粉末状のヒト成長ホルモン含有マイクロカプセル503mgを得た。

【0040】実施例15

乳酸-グリコール酸共重合体(乳酸/グリコール酸=50/50(モル%)、重量平均分子量10000)1.89gと酸化亜鉛10mgとをジクロロメタン3.4mlに溶解し、乳酸-グリコール酸共重合体・酸化亜鉛体の有機溶媒溶液を得た。この溶液にヒト成長ホルモン凍結乾燥粉末100mgを添加し、実施例1と同様に処理して粉末状のヒト成長ホルモン含有マイクロカプセル1.41gを得た。

実施例16

乳酸-グリコール酸共重合体(乳酸/グリコール酸=50/50(モル%)、重量平均分子量12000)1.89gと酸化亜鉛10mgとをジクロロメタン3.5mlに溶解し、乳酸-グリコール酸共重合体・酸化亜鉛体の有機溶媒溶液を得た。この溶液にヒト成長ホルモン凍結乾燥粉末100mgを添加し、実施例1と同様に処理して粉末状のヒト成長ホルモン含有マイクロカプセル1.41gを得た。

【0041】実施例17

乳酸-グリコール酸共重合体(乳酸/グリコール酸=50/50(モル%)、重量平均分子量14000)1.89gと酸化亜鉛10mgとをジクロロメタン4.0mlに溶解し、乳酸-グリコール酸共重合体・酸化亜鉛体の有機溶媒溶液を得た。この溶液にヒト成長ホルモン凍結乾燥粉末100mgを添加し、実施例1と同様に処理して粉末状のヒト成長ホルモン含有マイクロカプセル1.40gを得た。

実施例18

乳酸-グリコール酸共重合体(乳酸/グリコール酸=50/50(モル%)、重量平均分子量16000)1.89gと酸化亜鉛10mgとをジクロロメタン4.2mlに溶解し、乳酸-グリコール酸共重合体・酸化亜鉛体の有機溶媒溶液を得た。この溶液にヒト成長ホルモン凍結乾燥粉末100mgを添加し、実施例1と同様に処理して粉末状のヒト成長ホルモン含有マイクロカプセル1.34gを得た。

【0042】比較例1

乳酸-グリコール酸共重合体(乳酸/グリコール酸=5

0/50 (モル%)、重量平均分子量15000)をジクロロメタンに溶解し(950mg/ml)、乳酸-グリコール酸共重合体の有機溶媒溶液を得た。この溶液1mlとヒト成長ホルモン凍結乾燥粉末のジクロロメタン溶液(50mg/ml)1mlとを混合し、実施例1と同様に処理して粉末状のヒト成長ホルモン含有マイクロカプセル490mgを得た。

【0043】比較例2

乳酸-グリコール酸共重合体(乳酸/グリコール酸=50/50 (モル%)、重量平均分子量10000)1.90gをジクロロメタン2.6mlに溶解し、乳酸-グリコール酸共重合体の有機溶媒溶液を得た。この溶液にヒト成長ホルモン凍結乾燥粉末100mgを添加し、実施例1と同様に処理して粉末状のヒト成長ホルモン含有マイクロカプセル1.28gを得た。

比較例3

乳酸-グリコール酸共重合体(乳酸/グリコール酸=50/50 (モル%)、重量平均分子量12000)1.90gをジクロロメタン2.8mlに溶解し、乳酸-グリコール酸共重合体の有機溶媒溶液を得た。この溶液にヒト成長ホルモン凍結乾燥粉末100mgを添加し、実施例1と同様に処理して粉末状のヒト成長ホルモン含有マイクロカプセル1.18gを得た。

【0044】比較例4

乳酸-グリコール酸共重合体(乳酸/グリコール酸=50/50 (モル%)、重量平均分子量14000)1.90gをジクロロメタン3.0mlに溶解し、乳酸-グリコール酸共重合体の有機溶媒溶液を得た。この溶液にヒト成長ホルモン凍結乾燥粉末100mgを添加し、実施例1と同様に処理して粉末状のヒト成長ホルモン含有

マイクロカプセル0.89gを得た。

比較例5

乳酸-グリコール酸共重合体(乳酸/グリコール酸=50/50 (モル%)、重量平均分子量16000)1.90gをジクロロメタン3.2mlに溶解し、乳酸-グリコール酸共重合体の有機溶媒溶液を得た。この溶液にヒト成長ホルモン凍結乾燥粉末100mgを添加し、実施例1と同様に処理して粉末状のヒト成長ホルモン含有マイクロカプセル1.26gを得た。

【0045】〔実験例〕

実験例1

実施例7で得られたヒト成長ホルモンおよびPLGA・酸化亜鉛体含有マイクロカプセル308mgを分散媒(分散媒の組成:マンニトール(5%),カルボキシメチルセルロース(0.5%),ツイーン20(0.1%)を蒸留水に溶解し、酢酸でpH6.8に調整)(以下、同様)2.25mlに、実施例8で得られたヒト成長ホルモンおよびPLGA・酸化亜鉛体含有マイクロカプセル351mgを分散媒2.25mlに、実施例9で得られたヒト成長ホルモンおよびPLGA・酸化亜鉛体含有マイクロカプセル327mgを分散媒1.75mlに、さらに比較例1で得られたヒト成長ホルモンおよびPLGA含有マイクロカプセル229mgを分散媒1.75mlに分散した。得られた分散液0.5ml(ヒトGH3mgを含有)をエーテル麻酔下にラット背部に皮下投与した。尾静脈より経時的に採血し血清を分取した。得られた血清中のヒトGH濃度をラジオイムノアッセイ(AbビーズHGH、栄研化学製)により測定した。得られた結果を〔表1〕に示す。

【表1】

成長ホルモン 含有徐放性製剤	血中濃度 (ng/ml)						
	1日	2日	4日	6日	7日	9日	11日
実施例7	16.7	8.6	8.4	14.8	26.6	13.5	2.8
実施例8	17.9	10.6	14.1	22.5	27.8	15.8	3.5
実施例9	14.0	8.5	15.8	33.9	28.2	17.8	7.7
比較例1	4.3	1.7	2.1	3.1	5.0	8.0	2.7

実施例7、8および9で得られたヒト成長ホルモンおよびPLGA・酸化亜鉛体含有マイクロカプセル投与群におけるヒトGH濃度は、比較例1で得られたヒト成長ホルモンおよびPLGA含有マイクロカプセル投与群に比べて有意に高値を示し、しかも長期の持続性を示した。本発明の製造法により、優れた放出性を示す徐放性製剤が製造できる。

【0046】実験例2

実施例15、16、17および18で得られたヒト成長ホルモンおよびPLGA・酸化亜鉛体含有マイクロカプセルの、それぞれ550mg、556mg、576mg

および573mgを実験例1に記載の分散媒3.38mlに；比較例2、3、4および5で得られたヒト成長ホルモンおよびPLGA含有マイクロカプセルの、それぞれ548mg、548mg、567mgおよび560mgを同様の分散媒3.38mlに分散した。得られた分散液0.75ml(ヒトGH6mgを含有)をエーテル麻酔下にラット背部に皮下投与した。尾静脈より経時的に採血し、血清を分取した。得られた血清中のヒトGH濃度を、実験例1記載のラジオイムノアッセイにより測定した。得られた結果を〔表2〕ないし〔表5〕に示す。

【表2】

成長ホルモン 含有徐放性製剤	血中濃度 (ng/ml)			
	4日	7日	9日	11日
実施例15	24.8	24.5	15.2	6.3
比較例2	13.8	8.1	5.1	3.9

【0047】

【表3】

成長ホルモン 含有徐放性製剤	血中濃度 (ng/ml)			
	4日	7日	9日	11日
実施例16	24.6	25.3	16.3	8.7
比較例3	9.2	10.1	9.6	6.8

【表4】

成長ホルモン 含有徐放性製剤	血中濃度 (ng/ml)			
	4日	7日	9日	11日
実施例17	12.5	35.4	29.5	9.7
比較例4	7.6	14.8	7.7	6.2

【0048】

【表5】

成長ホルモン 含有徐放性製剤	血中濃度 (ng/ml)			
	4日	7日	9日	11日
実施例18	11.8	31.8	35.5	11.3
比較例5	4.9	13.8	18.5	6.7

実施例15、16、17および18で得られたヒト成長ホルモンおよびPLGA・酸化亜鉛体含有マイクロカプセル投与群におけるヒトGH濃度は、それぞれ比較例2、3、4、5で得られたヒト成長ホルモンおよびPLGA含有マイクロカプセル投与群におけるヒトGH濃度

に比べて有意に高値を示した。

【0049】

【発明の効果】本発明によれば、成長ホルモンなどの生理活性ペプチドの取り込み率を高め、長期に亘り一定した高い値の血中濃度を示す徐放性製剤を提供できる。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☒ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.